

**FAGOSITOSIS MENCIT TERINFEKSI TUBERKULOSIS
SETELAH PERLAKUAN *Phyllophorus* sp. SEBAGAI
IMUNOMODULATOR
PHAGOCYTOSIS OF TUBERCULOSIS MICE AFTER *Phyllophorus*
sp. TREATMENT AS IMMUNOMODULATOR**

Erlix R. Purnama¹ dan Dwi Winarni²

¹Program Studi Biologi, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Negeri Surabaya

²Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga

Email: erlixpurnama@unesa.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *Phyllophorus* sp terhadap aktivitas fagositosis mencit yang terinfeksi *M. tuberculosis* dan mengetahui fraksi yang berpotensi sebagai imunomodulator. Dua puluh empat ekor mencit jantan dimasukkan dalam 2 jenis kontrol yang diberi pelarut CMC 0,5% (KN), CMC 0,5% dengan infeksi bakteri (KP), dan 4 jenis perlakuan yaitu ekstrak kasar (EK), fraksi non-polar (FN), fraksi semi polar (FS), dan fraksi polar (FP). Selama 14 hari, hewan coba diberi ekstrak dan fraksinasi, kecuali KN dan KP, dengan dosis 0,0462 g berat kering teripang per hari. Hari ke-15 semua hewan perlakuan kecuali KN diinjeksi intraperitoneal *M. tuberculosis* 10^6 sel/ml. Pada hari ke-17 mencit dikorbankan dan dilakukan pengambilan cairan intraperitoneal untuk uji aktivitas fagositosis. Berdasarkan analisis statistik diketahui bahwa fraksi non polar menunjukkan aktivitas tertinggi untuk aktivitas fagositosis mencit yang terinfeksi oleh *M. tuberculosis*. Hal ini berarti bahwa senyawa triterpene yang terkandung pada fraksi non polar memiliki potensi yang terbaik sebagai imunomodulator dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi-fraksi lain dari *Phyllophorus* sp.

Kata kunci: aktivitas fagositosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Phyllophorus* sp, imunomodulator

ABSTRACT

The research aims is to know the effects of giving treatment with *Phyllophorus* sp extract and fractions against phagocytic activity of mice after infected with *Mycobacterium tuberculosis* and to know the potential fractions as immunomodulatory. Twenty-four male mice divided into 2 kinds control, positive and negative control, and 4 kinds treatment given with 0.0462 g/dry weight each day there were crude extract, non-polar, semi polar, and polar fraction as a long 14 days. All mice injected with *Mycobacterium tuberculosis* 10^6 cell/ml by intraperitoneally at days 15th except negative control. At days 17th, all mice killed and taken out the intraperitoneal macrophage to induced with yeast to get the phagocytic activity. Non-polar fraction of *Phyllophorus* sp given the best activity based on statistical analysis and significant difference with the other treatments. It means that triterpene as active compound in non-polar fraction has the highest potency as immunomodulatory.

Keyword: phagocytic activity, *M. tuberculosis*, *Phyllophorus* sp, immunomodulatory

PENDAHULUAN

Berdasarkan laporan WHO tahun 2014, Indonesia merupakan penyumbang tuberkulosis nomor 5 di dunia (WHO, 2014, p. 12) dan tuberkulosis merupakan penyakit yang menyebabkan tingkat kematian tertinggi kedua setelah penyakit kardiovaskular dan penyakit mematikan yang paling berbahaya dari semua penyakit menular di Indonesia (de Jongh, 2010). Dari data dinas kesehatan Jawa Timur kasus tuberkulosis sepanjang tahun 2014 hingga Maret mencapai 40.985 kasus dengan angka kematian mencapai 119 kasus (SurabayaNews, 2015).

Imunitas merupakan suatu mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi. Respons imun terhadap bakteri atau benda asing yang berhasil mengadakan invasi ke tubuh akan disertai dengan inflamasi yang diikuti oleh migrasi sel – sel fagosit seperti makrofag dan neutrofil dari sistem sirkulasi menuju ke tempat terjadinya infeksi sebagai respons adanya benda asing di tempat tersebut. Komponen sistem imun terdiri dari komponen seluler dan humoral. Makrofag merupakan salah satu dari komponen seluler yang mengawali terjadinya respons imun dengan cara mengenali mikroba dan melakukan fagositosis. Terjadinya respons imun yang efektif mengisyaratkan bahwa makrofag mampu mengenali *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) dari bakteri sehingga mampu membedakan antara antigen dengan sel inang (Owen et al., 2013, p. 147).

Makrofag dalam fungsinya untuk mengenali antigen tergantung pada peran *pattern recognition receptor* (PRR). Reseptor manosa dan *scavenger receptor* merupakan kelompok PRR yang dimiliki oleh makrofag. Reseptor manosa mengenal gugus manosa yang merupakan bagian dari komponen dinding sel mikroba. *Scavenger receptor* pada makrofag dapat mengikat dinding sel bakteri sehingga mampu mengeliminasi bakteri di dalam sirkulasi. *Toll-like receptor* (TLR) juga merupakan komponen PRR yang dapat mengenali struktur molekul umum dari mikroorganisme yang dikenal sebagai PAMPs. Adanya pengenalan TLR dengan PAMPs menimbulkan transduksi sinyal pada makrofag untuk menstimulasi terbentuknya sitokin tipe 1 yaitu interleukin-12 (IL-12), IL-18, dan IL-23 sebagai respons atas hadirnya *mycobacteria* dan berperan untuk pengenalan tubuh terhadap mikroba (Delves et al., 2011, p. 6).

Beberapa jenis TLR yang berperan pada proses pengenalan terhadap antigen yaitu TLR-4 mampu mengenali lipopolisakarida (LPS) yang merupakan komponen dari bakteri Gram-negatif. *Toll-like receptor 2* (TLR-2) mampu mengenali polisakarida seperti glukana dan kitin yang merupakan komponen dari dinding sel yeast, selain itu

TLR-2 juga mampu mengenali komponen dari dinding sel *mycobacterium* dan bakteri Gram-positif. Koordinasi antara TLR-2 dan TLR-6 mampu mengenali peptidoglikan yang menjadi komponen dari bakteri Gram-positif dan zymosan yang juga merupakan komponen dinding sel yeast (Abbas et al., 2015, p. 55).

Sel imunokompeten yang juga berperan dalam fagositosis adalah neutrofil. Neutrofil merupakan salah satu fagosit polimorfonuklear (PMN) atau granulosit yang dibentuk dalam sumsum tulang. Neutrofil mampu menunjukkan aktivitas fagositik dan sitotoksik dengan cara bermigrasi dari sistem sirkulasi menuju ke tempat inflamasi dan infeksi atas pengaruh faktor kemotaksis. Peran utamanya adalah sebagai pertahanan awal imunitas nonspesifik terhadap infeksi antigen (Abbas et al., 2015, p. 14). Neutrofil juga mempunyai peran penting dalam proses fagositosis yeast karena neutrofil mempunyai enzim lisozom dan diduga melepas bahan fungisidal seperti *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) (Delves et al., 2011, p. 327).

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi dan tersebar di daratan dan lautan karena berada pada daerah beriklim tropis. Salah satu keanekaragaman hayati yang terdapat di lautan Indonesia adalah teripang yang dikenal juga sebagai mentimun laut (*sea cucumber*). Di pantai timur Surabaya spesies teripang yang tidak tercantum dalam daftar teripang bernilai komersial di pasar global yaitu *Phyllophorus* sp yang dalam bahasa lokal sering disebut sebagai terung. Di wilayah Surabaya dan sekitarnya, *Phyllophorus* sp memiliki nilai komersial hanya dalam bentuk makanan terung goreng dan beberapa jenis teripang lain biasanya dalam bentuk mentah digunakan sebagai bahan masakan cina yang dipercayai memiliki khasiat tertentu.

Phyllophorus sp secara kualitatif mengandung glikosida triterpen (Winarni, 2009) dan menunjukkan bioaktivitasnya sebagai anti jamur, anti mikrob, sitotoksik, dan imunomodulator (Aminin., 2012, p. 381-401). Imunomodulator adalah bahan-bahan yang dapat digunakan untuk mengembalikan fungsi respons imun yang terganggu dari berbagai komponen sistem imun (*imunorestorasi*), memperbaiki dan memperkuat respons imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem imun (*imunostimulant*) atau menekan respons imun yang fungsinya berlebihan (*imunosupresi*) (Murphy et al., 2012, p. 502). Glikosida triterpen memiliki peran yang kuat sebagai imunomodulator yaitu dengan menstimulasi aktivitas lisosom dan fagositosis makrofag mencit sehingga meningkatkan kadar IL-12 (Purnama, 2011) dan diharapkan dengan pemberian perlakuan *Phyllophorus* sp dapat meningkatkan aktivitas fagositosis mencit setelah terinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *Phyllophorus* sp terhadap aktivitas fagositosis mencit yang terinfeksi *M. tuberculosis* dan mengetahui fraksi yang berpotensi terbesar sebagai imunomodulator.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan 24 ekor mencit jantan dewasa belum pernah kawin dari jenis *Mus musculus* strain BALB/C dengan umur berkisar antara 3-4 bulan dan berat badan berkisar antara 30-40 g. Mencit jantan dimasukkan dalam 2 jenis kontrol yang diberi pelarut CMC 0,5% (KN) dan CMC 0,5% dan infeksi bakteri (KP), dan 4 jenis perlakuan yang diberi ekstrak kasar (EK), fraksi non polar (FN), fraksi semi polar (FS), dan fraksi polar (FP) dengan 4 kali pengulangan pada setiap perlakuan. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah teripang *Phyllophorus* sp, bakteri *M. tuberculosis* untuk menginduksi respons imun, bahan-bahan kimia untuk ekstraksi dan fraksinasi teripang: etanol, n-heksan, dan etil asetat serta untuk pelarut ekstrak dan fraksi yaitu CMC 0,5%, dan larutan *phosphate buffered saline* (PBS). Bahan-bahan untuk pengamatan aktivitas fagositosis: suspensi yeast, larutan NaCl, metanol 70%, karbol fuchsin, pewarna *crystal violet*, dan aquades. Alat untuk uji fagositosis yaitu haemositometer, mikroskop cahaya, dan *hand counter*.

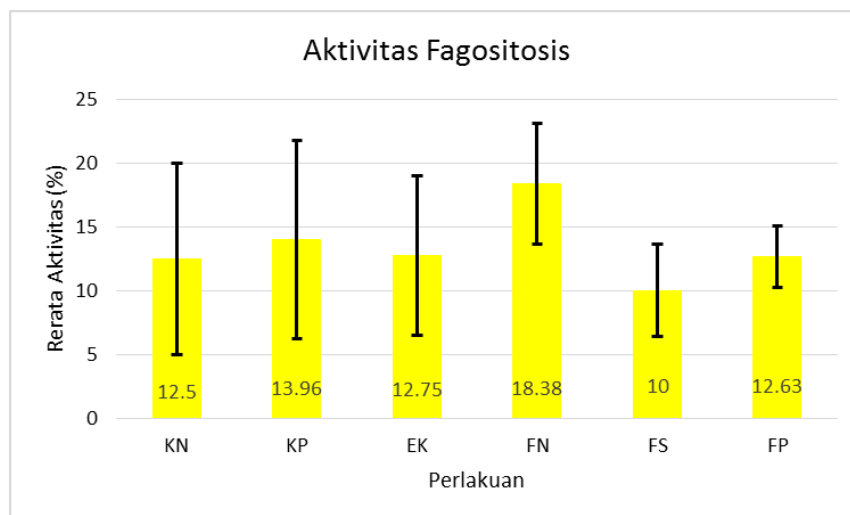
Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu tahap ekstraksi dan fraksinasi teripang, tahap perlakuan pada hewan coba, tahap infeksi hewan coba, dan tahap pengamatan aktivitas fagositosis hewan coba, serta tahap analisis data. Pada tahap awal, teripang *Phyllophorus* sp sebagian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dan sebagian lagi difraksinasi bertingkat berturut-turut menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol. Tahap perlakuan dilakukan dengan cara pemberian ekstrak teripang dan fraksi-fraksinya diberikan secara per oral pada mencit mulai hari ke 1 hingga akhir penelitian setiap hari selama 14 hari. Dosis yang diberikan berdasar pada Aminin (2012, p. 381-401) yaitu setara dengan 0,0462 g berat kering teripang per mencit. Tahap infeksi dilakukan pada hari ke-15 perlakuan, mencit dipindahkan ke laboratorium *biosafety level 3* (BSL-3) FKH, Unair untuk dilakukan injeksi intraperitoneal dengan 0,1 ml suspensi yang mengandung 10^6 bakteri *M. tuberculosis*. Pemeliharaan hewan coba setelah injeksi *M. tuberculosis* hingga pengambilan sampel dilakukan di BSL-3 FKH, Unair.

Tahap uji fagositosis dilakukan pada hari ke-17 yang dimulai dari pengambilan cairan peritoneal, penghitungan jumlah fagosit, penyiapan suspensi yeast sebagai bahan uji, inkubasi, pembuatan apusan fagosit hingga pengambilan data. Tahap analisis data yang diperoleh dilakukan analisis menggunakan software SPSS 21.0. Normalitas data diuji distribusinya dengan uji Kolmogorov-Smirnov, analisis varian seluruh perlakuan menggunakan uji ANOVA dan untuk mengetahui fraksi atau ekstrak yang memiliki potensi terbesar sebagai imunomodulator digunakan uji Duncan dengan seluruh uji dilakukan pada $\alpha = 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas fagositosis memberikan gambaran respons imun non-spesifik pada mencit setelah diberi berbagai perlakuan ekstrak dan fraksi-fraksi *Phyllophorus sp.* Data rerata aktivitas fagositosis yang diperoleh disajikan pada Gambar 1.

Dari uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data aktivitas fagositosis adalah data berdistribusi normal dengan $p > 0,05$. Data aktivitas fagositosis dilanjutkan



Gambar 1. Rerata Persentase Aktivitas Fagositosis pada Berbagai Jenis Perlakuan.

Keterangan:

KN: kontrol negative

KP: kontrol positif

EK: ekstrak kasar

FN: fraksi nonpolar

FS: fraksi semipolar

FP: fraksi polar *Phyllophorus sp*

dengan uji ANOVA dan hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh ($p > 0,05$) pemberian berbagai perlakuan terhadap aktivitas fagositosis. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian perlakuan EK, FN, FS, dan FP dengan dosis 0,0462 g berat kering teripang tidak berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis mencit dan disebabkan pula oleh besarnya standar deviasi data.

Dari data kontrol KN dan KP dapat diketahui bahwa aktivitas fagositosis antara perlakuan yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan perlakuan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan beda tidak signifikan yaitu pada kelompok KN $12,5 \pm 7,5$ % dan KP $13,96 \pm 7,75$ %. Hal ini seperti yang tersajikan pada Gambar 1 bahwa standar deviasi antar kedua perlakuan yaitu KN dan KP terjadi tumpang tindih nilai sehingga secara analisis variansi menunjukkan tidak ada variansi dari pemberian perlakuan terhadap aktivitas fagositosis.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar maka data perlakuan KN, KP, dan EK diuji variansinya menggunakan analisis varians. Hasil uji variansi seperti pada Tabel 1 menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh pemberian ekstrak dengan dosis 0,0462 g berat kering teripang terhadap aktivitas fagositosis ($p > 0,05$).

Kontrol KP memiliki aktivitas fagositosis tertinggi bila dibandingkan dengan kontrol KN dan perlakuan EK.

Tabel 1. Hasil Uji ANOVA untuk Mengetahui Pengaruh Ekstrak Terhadap Aktivitas Fagositosis

Perlakuan	N	Rerata (%)	SD	ANOVA	
				Hasil	Simpulan
KN	4	12,5	7,51	F = 0,554 p = 0,593	beda tidak signifikan
KP	4	13,96	7,74		
EK	4	9,38	1,55		

Pemberian perlakuan ekstrak *Phyllophorus* sp tidak berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis dapat diduga karena senyawa-senyawa aktif yang terdapat ekstrak kasar kurang berpotensi sebagai imunomodulator yang berperan dalam aktivitas fagositosis. Selain itu juga disebabkan karena besarnya standar deviasi yang tinggi pada perlakuan KN, KP, dan EK menyebabkan data tersebut saling tumpang tindih. Dari Tabel 2 dapat terlihat bahwa perlakuan FN memiliki aktivitas fagositosis tertinggi bila dibandingkan dengan perlakuan EK, FS dan FP. Sedangkan perlakuan FS memiliki aktivitas fagositosis terendah bila dibandingkan dengan perlakuan EK, FN dan FP.

Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan FN menunjukkan aktivitas fagositosis yang tertinggi dan beda signifikan dengan perlakuan EK, FS, dan FP. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian fraksi non-polar memiliki pengaruh terhadap aktivitas fagositosis dan menunjukkan adanya beda signifikan aktivitas fagositosis terhadap kelompok perlakuan yang lain. Aktivitas fagositosis antar perlakuan EK, FS, dan FP menunjukkan beda tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian perlakuan ekstrak kasar, fraksi semi polar, dan fraksi polar dari *Phyllophorus* sp dengan dosis 0,0462 g berat kering teripang memiliki aktivitas fagositosis yang hampir sama.

Pada penelitian ini digunakan yeast sebagai antigen terhadap makrofag untuk mengetahui aktivitas fagositosis. Penggunaan yeast ini sebagai antigen menggantikan posisi *M. tuberculosis* untuk aktivitas fagositosis *in vitro*. Dinding sel yeast memiliki kesamaan dengan dinding sel *M. tuberculosis* yaitu adanya mannoprotein. Sedangkan pada makrofag memiliki reseptor yang sama antara reseptor terhadap yeast dan *M. tuberculosis* yaitu pada reseptor mannanosa dan kompleks TLR2/TLR1-TLR6. Hal ini mampu mengurangi adanya pengaruh variabel antigen yang digunakan saat aktivitas fagositosis *in vitro* menggunakan yeast. Makrofag merupakan fagosit yang lebih kuat daripada sel polimorfonuklear seperti neutrofil, karena seringkali mampu memfagositosis sampai 100 bakteri. Makrofag juga mempunyai kemampuan untuk menelan partikel yang jauh lebih besar, bahkan sel darah merah utuh, sedangkan neutrofil tidak mampu memfagositosis partikel yang jauh lebih besar dari bakteri.

Aktivitas fagositosis antara perlakuan KN dan KP menunjukkan beda tidak signifikan. Hal ini berarti bahwa infeksi *M. tuberculosis* yang diberikan sebelum dilakukan uji aktivitas fagositosis *in vitro* tidak berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis. Selain itu keberadaan *M. tuberculosis* di dalam makrofag sebagai bakteri intraseluler tidak berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis yang dalam hal ini menggunakan antigen berupa yeast dan hal ini dapat ditunjukkan antara kelompok yang

tidak diinfeksi dengan kelompok yang diinfeksi memiliki aktivitas fagositosis yang beda tidak signifikan.

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri intraseluler sehingga dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan mampu menghambat pembentukan fagositom dan lisosom menjadi fagolisosom sehingga terlindung dari penghancuran bakteri terfagosit oleh lisosom. Selain dari makrofag terdapat pula bagian dari *M. tuberculosis* yang dapat menyebabkan kegagalan dalam fusi fagolisosom yaitu *mannosylated lipidoarabinomannan* (ManLAM) yang analog dengan *phosphatidylinositol-3-phosphat* pada makrofag dan bertanggung jawab terhadap penghambatan fagolisosom *M. tuberculosis* dari fagositom matur dan pengambilan lisosom hidrolase (Abbas et al., 2014, p. 128).

Pemberian fraksi-fraksi *Phyllophorus sp* berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis bila dibandingkan dengan kelompok ekstrak kasar. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung dalam fraksi memiliki peran dalam meningkatkan aktivitas fagositosis. Mencit jantan yang diberi perlakuan fraksi nonpolar

Tabel 2. Hasil Uji ANOVA untuk Mengetahui Pengaruh Fraksi-Fraksi Terhadap Aktivitas Fagositosis

Perlakuan	N	Rerata (%)	SD	ANOVA	
				Hasil	Simpulan
EK ^b	4	9,38	0,77	F = 9,490 p = 0,002	beda signifikan
FN ^a	4	18,38	4,75		
FS ^b	4	7,63	2,69		
FP ^b	4	11,13	2,32		

Keterangan:

Superscript yang sama menunjukkan beda tidak signifikan dari hasil uji Duncan

memiliki aktivitas fagositosis yang tertinggi dan beda signifikan dengan perlakuan ekstrak, fraksi semi polar, dan fraksi polar. Hal ini berarti senyawa triterpen yang terkandung dalam fraksi non-polar memiliki potensi terbesar dalam aktivitas fagositosis. Peran glikosida triterpen sebagai imunomodulator yaitu dengan meningkatkan fagositosis makrofag mencit terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* pada konsentrasi 0,001 µg/mL (Aminin, 2012, p. 381-401).

Mekanisme kerja bahan aktif yang terkandung dalam fraksi nonpolar dalam mempengaruhi peningkatan aktivitas fagositosis diperkirakan dimulai saat proses pengenalan struktur *M. tuberculosis* yang disebut *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) oleh *pattern recognition receptors* (PRRs) yang diperankan oleh *toll-like receptor* (TLR). Menurut Abbas, et al (2015, p. 55), TLR yang berperan dalam merespons adanya *mycobacteria* adalah TLR2.

Berdasarkan pernyataan Hua *et al.* (2009) glikosida triterpen merupakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tubuh teripang dan berpotensi sebagai imunomodulator. Selain itu glikosida triterpen juga memiliki peranan penting dalam imunitas dan memiliki efek farmakologi yang luas (Caulier, 2011). Namun data penelitian ini memperlihatkan bahwa senyawa triterpen yang terkandung pada fraksi non-polar memiliki potensi sebagai imunomodulator yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain berdasarkan data aktivitas fagositosis. Sehingga senyawa triterpen memiliki potensi yang besar sebagai imunomodulator (Aminin, 2012, p. 381-401).

KESIMPULAN DAN SARAN

Dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh pemberian ekstrak kasar teripang *Phyllophorus sp* pada mencit yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap aktivitas fagositosis mencit dan fraksi yang berpotensi berperan sebagai imunomodulator adalah fraksi non-polar dengan indikator memiliki aktivitas fagositosis tertinggi dan beda signifikan dibandingkan dengan fraksi polar dan fraksi semipolar. Disarankan pada penelitian lebih lanjut agar dapat mengetahui dosis optimal ekstrak dan fraksi-fraksi *Phyllophorus sp* yang berpotensi untuk meningkatkan imunitas tubuh mencit terhadap infeksi *M. tuberculosis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Litchman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic Immunology*. 4th Edition. Elsevier. Philadelphia.
- Abbas, A. K., Litchman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Cellular and Molecular Immunology*. 8th Edition. Elsevier. Philadelphia.
- Caulier, G., Dyck, S., Gerbaux, P., Eeckhaut, I., & Flammang, P., (2011). Review of Saponin Diversity in Sea Cucumber Belonging to the Family Holothuriidae. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*. 31 Januari 2011.
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2011). *Roitt's Essential Immunology*. 12th Edition. Willey-Blackwell. Oxford.
- Hua, H., Hua-Yang, Y., Ling, L., Liu, B., La, M., & Zhang, H. (2009). Antifungal Active Triterpene Glycoside from Sea Cucumber *Holothuria scabra*. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 44 (6), 620-624.
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology*. 8th Edition. Garland Science. New York.
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A. (2013). *Kuby Immunology*. International Edition. W. H. Freeman and Company. New York
- Purnama, E. R. (2011). Potensi Immunogenik Teripang Lokal Surabaya *Phyllophorus sp* Sebagai Modulator Imunitas Alami Terhadap Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. *Tesis*. Program Studi S2 Biologi Universitas Airlangga.
- SurabayaNews.co.id. (2015). Jatim Duduki Peringkat Kedua Kasus Tuberkulosis. 20 Maret. <http://surabayanews.co.id/2015/03/20/19712/jatim-duduki-peringkat-kedua-kasus-tuberkulosis.html>. Surabaya
- Winarni, D., M. Affandi., & E. D. Masithah. (2009). Eksplorasi Potensi Teripang Pantai Timur Surabaya Sebagai Modulator Imunitas Alami Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. *Laporan Penelitian*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga. Surabaya.
- World Health Organization. (2014). Global Tuberculosis Report 2014. Swiss.